

# TeSeE™ WESTERN BLOT

32 TESTE

355 1169

---

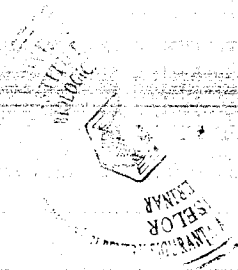
**REACTIVI PENTRU CONFIRMAREA *in vitro* A PROBELOR  
SUSPECTATE POZITIVE EST**

---



Validare si certificare OIE pentru scopul utilizarii  
Numar de inregistrare: 20090105





## CUPRINS

- 1 – GENERALITATI
- 2 – PRINCIPIUL DE TESTARE
- 3 – CONTINUTUL TRUSEI
- 4 – PROBE
- 5 – PROCEDEUL DE TESTARE CU GEL MINI BLOT™
  - 5.1 Reactivi si materiale necesare dar neincluse in trusa
  - 5.2 Pregatirea reactivilor
  - 5.3 Purificarea probelor
  - 5.4 Electroforeza
  - 5.5 Transferul proteinelor
  - 5.6 Imunoblotarea
- 6 – PROCEDEUL DE TESTARE CU GEL CRITERION™ XT
  - 6.1 Reactivi si materiale necesare dar neincluse in trusa
  - 6.2 Pregatirea reactivilor
  - 6.3 Purificarea probelor
  - 6.4 Electroforeza
  - 6.5 Transferul proteinelor
  - 6.6 Imunoblotarea
- 7 – INTERPRETAREA REZULTATELOR
- 8 – PRECAUTII
- 9 – INSTRUCIUNI DE IGIENA SI PROTECTIA MUNCII
- 10 – BIBLIOGRAFIE



## 1 - GENERALITATI

Encefalopatiile Spongiforme Transmisibile (EST) au fost pentru prima data raportate in secolul al 18-lea la oaie (Scrapie) si mai recent la cervide cum ar fi caprioara si elanul (Boala casectizanta cronica, MCC sau Chronic Wasting Disease, CWD) si la vite (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE). Si oamenii sunt sensibili la anumite forme de EST cum ar fi boala Kuru, boala Creutzfeld-Jakob (CJD) sau sindromul Gertsmann-Straüssfer-Scheinker (GSS). Aparitia noii variante a bolii Creutzfeld-Jakob (vCJD) la om a fost corelata cu certitudine de consumul de carne sau produse din carne infectate cu ESB. Una din caracteristicile principale ale EST este acumularea progresiva in sistemul nervos central a unei izoforme anormale a proteinei prionice naturale (PrP<sup>c</sup>), denumita PrP<sup>res</sup>. Aceasta PrP<sup>res</sup> specifica de boala se caracterizeaza printr-o rezistenta crescuta la proteaze. TeSeE™ WESTERN BLOT permite identificarea calitativa a PrP<sup>res</sup> dupa tratamentul proteolitic care duce la truncarea capatului amino-terminal si reducerea masei moleculare.

Programele de supraveghere activa si pasiva aplicate la nivel mondial sunt destinate detectiei ESB, a scrapiei sau a MCC la animalele infectate. Aceste programe au dus la identificarea unui numar crescut de cazuri pozitive in laboratoarele de screening. Acele probe pozitive (ce definesc animalele suspecte de infectie) sunt confirmate sistematic ca "infectate EST" prin demonstrarea modificarilor de tip spongiform tipice prin analiza histopatologica, sau prin detectia PrP anormale prin Imunohistochimie (IHC), sau a SAF (Scrapie Associated Fibrils) prin microscopie electronica. Aceste metode de confirmare necesita expertiza de nivel inalt la interpretare si sunt in general consumatoare de timp si costisitoare. Si tehnica Western Blot poate fi luata in considerare ca metoda alternativa de confirmare a probelor suspectate EST pozitive.

Datele pentru validarea acestui kit au fost certificate de catre OIE, pe baza opiniei expertilor, ca fiind potrivite pentru detectia post-mortem a encefalopatiilor spongiforme transmisibile (EST) la bovine (encefalopatia spongiforma bovina, ESB), la ovine si caprine (ESB, scrapie) si pentru urmatoarele scopuri:

1. Pentru confirmarea probelor prezumtiv pozitive din laboratoarele de screening cu programe de supraveghere active/pasive. Orice proba cu rezultat negativ conform criteriilor de interpretare ale testului TeSeE™



Western Blot, consecutiv unui rezultat pozitiv obtinut printr-un test rapid ar trebui sa fie testata cu una dintre metodele de confirmare certificate OIE, imunohistochimie (IHC) sau SAF-imunoblot

2. Pentru a confirma raspandirea infectiei cu una dintre maladiile asociate EST (ESB, SCRAPIE, MCC) in contextul unui studiu epidemiologic intr-o tara cu prevalenta scazuta.
3. Pentru a estima raspandirea infectiei in vederea facilitarii analizei de risc (de ex. Studii, implementarea masurilor de control) si pentru a sustine demonstrarea eficientei politicilor de eradicare.

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT foloseste acelasi principiu de testare ca si testele rapide ELISA Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ oaie/capra) incluzand etapele de purificare si concentrare preliminara ale PrP<sup>res</sup>, apoi detectia extrem de sensibila prin imunoblotare.

Acesta se poate folosi eficient pentru confirmarea animalelor suspecte EST si identificarea susei (tipului) de EST la ovine.

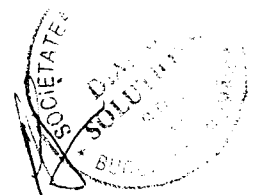
## 2 – PRINCIPIUL DE TESTARE

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT permite detectia PrP<sup>res</sup> in probe de tesut nervos (bovine, ovine, caprine, cervide, ...) sau tesuturi periferice (cervide) recoltate de la animale infectate.

Procedul de testare incepe cu digestia proteinei prionice celulare (PrP<sup>c</sup>), urmata de purificarea si concentrarea PrP<sup>res</sup> specifica de boala. Detectia PrP<sup>res</sup> se efectueaza prin migrare electroforetica urmata de imunoblotare, folosind un anticorp monoclonal cu specificitate inalta pentru PrP<sup>res</sup>.

Procedul de testare se compune din urmatoarele etape:

- Omogenizarea probelor,
- Digestia PrP<sup>c</sup> cu proteinaza K,
- Purificarea si concentrarea PrP<sup>res</sup>,
- Electroforeza si transferul pe o membrana,
- Imunoblotarea.



### 3 – COMPOZITIA TRUSEI

Etichetare	Tipul reactivului	Prezentare	Conditii de stocare
<b>Grinding Tubes</b>	Eprubete de omogenizare ce contin sfere ceramice in solutie tamponata <sup>(1)</sup> . Conservant: Proclin 300 (0,1%).	1 punga (35 eprubete)	+2°C la + 25°C
<b>A</b>	Solutie de denaturare. Gata de utilizare	1 flacon (20 ml)	+2°C la + 25°C
<b>B</b>	Solutie de clarificare. Colorant: albastru de bromfenol. Gata de utilizare	1 flacon (20 ml)	+2°C la + 25°C
<b>PK</b>	Proteinaza K. Colorant: rosu de fenol	1 vial (0,5 ml)	+2°C la +8°C
<b>Ab I</b>	Anticorp monoclonal primar <sup>(1)</sup> anti-PrP (10x)	1 flacon (8 ml)	+2°C la +8°C
<b>Ab II</b>	Anticorp secundar <sup>(1)</sup> : IgG oaie (Sheep) anti-soarece (Mouse) (H+L) marcati cu peroxidaza (HRP) (10x)	1 flacon (10 ml)	+2°C la +8°C
<b>BI</b>	Solutie de blocare <sup>(1)</sup>	1 flacon (10 ml)	+2°C la +8°C

<sup>(1)</sup> Acesti reactivi contin conservantul ProClin® 300 in proportie de 0,1%

### 4 - PROBELE

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT este destinat detectiei EST la bovine (Encefalita Spongiforma Bovina, ESB), la ovine si caprine (ESB si scrapie) si la cervide (Maladia Casectizanta Cronica, MCC).

Acest test se poate efectua direct din omogenatul de proba (tubul de omogenizare) preparat cu testul rapid Bio-Rad ELISA (TeSeE™ SAP, TeSeE™ oaie/capra).

**La bovine:** purificarea PrP<sup>res</sup> se efectueaza din probe de SNC. Deoarece distributia PrP<sup>res</sup> este eterogena in sistemul nervos central, pentru detectia optima este preferabila prelevarea din aria obex a trunchiului cerebral. Seringa de prelevare (cod 355 1175) permite esantionarea rapida si usoara a probelor de obex intr-o maniera sigura si lipsita de risc. Consultati protocolul de prelevare furnizat impreuna cu seringile de prelevare.



**La rumegatoare mici:** purificarea PrP<sup>res</sup> se efectueaza din probe de tesut SNC sau tesuturi periferice (ganglioni limfatici). Probele se taie si se cantaresc individual.

**La cervide:** purificarea PrP<sup>res</sup> se efectueaza din probe de tesut SNC sau tesuturi periferice (ganglioni limfatici). Probele se taie si se cantaresc individual.

## 5 – PROCEDUREL DE TESTARE CU GEL MINI BLOT™

### 5.1 – REACTIVI SI MATERIALE NECESARE NEINCLUSE IN TRUSA

#### 5.1.1 – REACTIVI SI CONSUMABILE

Pipete gradate (5, 10, 25 ml), eprubete conice (50 ml), eprubete de polipropilena de 2 ml (Eppendorf) cu capac, PARAFILM®M.

#### Purificarea probelor

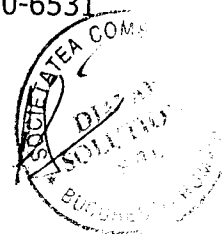
Tampon Laemmli pentru probe	30 ml	Bio-Rad, cod 161-0737
2-Mercaptoethanol	25 ml	Bio-Rad, cod 161-0710
SDS	100 g	Bio-Rad, cod 161-0301
Seringi de calibrare	200	Bio-Rad, cod 3551174

#### Electroforeza in gel

Acrilamida 40% 29:1	500 ml	Bio-Rad, cod 161-0146
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	1 L	Bio-Rad, cod 161-0799
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	1 L	Bio-Rad, cod 161-0798
Albastru de Bromfenol	10 g	Bio-Rad, cod 161-0404
Sucroza	1 kg	Bio-Rad, cod 161-0720
Persulfat de Amoniu	10 g	Bio-Rad, cod 161-0700
TEMED	5 ml	Bio-Rad, cod 161-0800
Tris/Glicina/SDS (tampon de migrare) (10x)	1 L	Bio-Rad, cod 161-0732
Kaleidoscope prestained standards MagicMark™ XP Western Standard (Standard de Masa Moleculara)	500 µl 250 µl	Bio-Rad, cod 161-0324 Invitrogen, cod LC5602

#### Imunoblotare

Etanol (Normapur)	1L	VWR, cod 2821-296
Tris/CAPS (tampon de transfer) (10x)	1L	Bio-Rad, cod 161-0778
Hartie de filtru (hartie de transfer pt geluri turnate manual Mini Blot™)	50 bucati	Bio-Rad, cod 170-3932
Membrana PVDF (0.2 µm)	10 bucati	Bio-Rad, cod 162-0175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, cod 170-6531



TFS (tampon de spalare) (10x)	1 L	Bio-Rad, cod 161-0780
ECL (substrat pt conjugat)	125 ml	Amersham, cod RPN2109
ECL Hyperfilms (18 x 24 cm)	25 filme	Amersham, cod RPN2103K
Development folders	30 bucati	Applied Biosystems, cod T2258
Solutie dezvoltare Kodak LX24	pt-20 L	VWR-sau Kodak
Solutie fixatoare AL4	pt 20 L	VWR sau Kodak

### 5.1.2 - ECHIPAMENT

Pipete reglabile (10, 40, 200, 1000 µl)  
 Cilindri gradati (1 L si 2 L), forceps (pensa) de plastic, tavite, vortex  
 Caseta de expunere si camera obscura pentru dezvoltare filme.

#### Purificarea probelor

TeSeE Precess 48™	Bio-Rad, cod 3580200
TeSeE Precess 24™	Bio-Rad, cod 3581070
Heater blocks (baie uscata, 3 blocuri)	Bio-Rad, cod 3589057
Cu Bloc de 20 locuri pt Heater block	Bio-Rad, cod 3589072
Centrifuga - 220/240 V	Bio-Rad, cod 3581396
Drum rotor (rotor vertical)	Bio-Rad, cod 3589189
Adaptoare pt rotor (x6)	Bio-Rad, cod 3589191

#### Electroforeza geluri

Mini-PROTEAN® Tetra Cell, modul electroforeza	Bio-Rad, cod 165-8002
5 placi spatatoare	Bio-Rad, cod 165-3312
Sursa de tensiune PowerPac HC 220/240 V	Bio-Rad, cod 164-5052

#### Transfer

Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, cod 170-3946
------------------	-----------------------

#### Imunoblotare

Western Processor baza	Bio-Rad, cod 3580098
Western Processor Mini Blot™ kit	Bio-Rad, cod 170-3988



## 5.2 - PREGATIREA REACTIVILOR

### 5.2.1 – PURIFICAREA PROBELOR

#### ● **Proteinaza K**

Solutie de proteinaza K diluata in reactivul A:

- 1 ml Reactiv A
- 20 µl Proteinaza K

Amestecati bine prin rasturnare pana se obtine o solutie omogena. Dupa reconstituire, proteinaza K diluata este stabila 10 ore la temperatura camerei (+18°C la +30°C).

#### ● **Solutia Laemmli**

Solutie de SDS + 2-Mercaptoetanol + Tampon Laemmli pentru probe:

- 0,6 g SDS
- 1,5 ml 2-Mercaptoetanol

Amestecati prin rasturnare.

- 28,5 ml tampon Laemmli pentru probe

Solutia se portioneaza in alicote de 4 ml si se pastreaza la -20°C. Alicotele decongelate pot fi recongelate.

Nota: Se recomanda prepararea solutiei Laemmli cu 1 ora inainte de utilizare, verificand ca SDS s-a dizolvat complet.

### 5.2.2 – ELECTROFOREZA

#### ● **Turnarea manuala a gelurilor discontinue de acrilamida**

Gelul trebuie sa aiba o grosime de 1,5 mm.

Folosind modulul de turnare Mini Blot™, gelul de separare se toarna primul (13,5% acrilamida, pH 8,8), apoi odata ce acesta s-a polimerizat se adauga deasupra gelul de concentrare (stacking, 3% acrilamida, pH 6.8).

Gelul de separare (1 gel)

- 2,8 ml Acrilamida 40%, 29:1
- 1,7 ml tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 / SDS (1)
- 1,3 ml solutie de sucroza 50% (2)
- 2,5 ml apa distilata

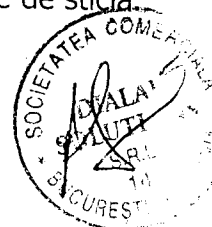
Amestecati prin rasturnare, apoi adaugati:

- 43 µl persulfat de amoniu 10% (3)
- 9 µl TEMED

Turnati 7 ml de solutie de gel intre placi si pastrati solutia ramasa pentru controlul polimerizarii. Acoperiti usor pana la partea superioara cu 1 ml tampon Tris-HCl 0,3 M pH 8,8 /SDS (4) astfel incat suprafata gelului sa nu se usuce.

Lasati gelul la polimerizat timp de 15-20 minute la temperatura camerei (+18°C la +30°C). Verificati daca solutia ramasa a polimerizat.

Eliminati tamponul in exces prin rasturnarea ansamblului de placute de sticla.





**Gel de concentrare (Stacking) (1 gel)**

- 4 ml solutie acrilamida 3% (7)
- 28 µl persulfat de amoniu 10% (3)
- 6 µl TEMED

Amestecati prin rasturnare.

Turnati incet si cu atentie gelul de concentrare peste gelul de separare si pastrati solutia ramasa pentru controlul polimerizarii.

Asezati pieptenele avand grija sa nu prindeti bule de aer pe langa dintii acestuia. Lasati gelul la polimerizat timp de 5-10 minute la temperatura camerei (+18°C la +30°C). Verificati daca solutia ramasa de control s-a polimerizat.

**(1) Solutia de tampon 1,5 M Tris-HCl buffer, pH 8,8 / SDS**

- 0,2 g SDS
- 50 ml tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Solutia se poate pastra la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

**(2) Solutia de sucroza 50%**

- 25 g Sucrose
- Se aduce la 50 ml cu apa distilata

Solutia de sucroza se poate pastra la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

**(3) Solutia de persulfat de amoniu 10%**

- 5 g Persulfat de Amoniu
- Se aduce la 50 ml cu apa distilata

Solutia de persulfat de amoniu se portioneaza si se pastreaza la -20°C. Solutia decongelata se poate pastra la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

**(4) Solutia de tampon Tris-HCl 0,3 M, pH 8,8 / SDS**

- 40 ml apa distilata
- 10 ml tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 / SDS

Solutia se pastreaza la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

**(5) Solutia de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 / SDS**

- 0,2 g SDS
- 50 ml tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

Solutia se pastreaza la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

**(6) Solutia de albastru de bromfenol 1%**

- 0,5 g Bromophenol Blue
- 50 ml apa distilata

Solutia de albastru de bromfenol se pastreaza la temperatura camerei (+18°C la +30°C) timp de 6 luni.



### **(7) Solutia de acrilamida 3%**

- 3,8 ml acrilamida 40%, 29:1
- 10 ml tampon 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 / SDS (5)
- 6 ml Sucreza 50% (2)
- 500 µl albastru de bromfenol 1% (6)
- Se adauga pana la 50 ml apa distilata

Solutia se pastreaza la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

### **• Standard precolorat Kaleidoscope**

Standardul Kaleidoscope se prepara in cursul denaturarii probelor si inainte de incarcarea in gelul de acrilamida. Preparati o dilutie 1/12 in solutie Laemmli (de exemplu 10 µl de standard Kaleidoscope + 110 µl de solutie Laemmli). Consultati prospectul de utilizare al standardului pentru conditiile de pastrare.

### **• Standardul MagicMark™ XP Western**

Markerul de masa moleculara MagicMark™ XP se prepara in cursul denaturarii probelor inainte de incarcarea in gelul de acrilamida.

Preparati o dilutie 1/12 in solutie Laemmli pentru probe, de exemplu 10 µl de MagicMark™ XP + 110 µl de solutie Laemmli pentru probe.

Conditiiile de pastrare sunt precizate in prospectul MagicMark™ XP.

### **• Tamponul de migrare Mini Blot™**

Solutia Tris-Glycine-SDS (1x).

Preparati o dilutie de 1/10.

**Pentru 1 tanc este nevoie de 1 L de tampon diluat:**

- 100 ml tampon Tris-Glycine-SDS (10x)
- 900 ml apa distilata

Omogenizati. Solutia nu se poate pastra.

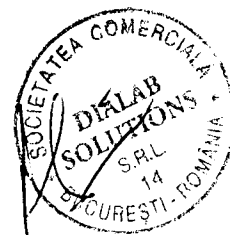
## **5.2.3 – TRANSFERUL PROTEINELOR**

### **• Tampon de transfer**

Solutia de Tris/CAPS-Etanol 15%. **Pentru 1 tanc de transfer sunt necesari 2,5 L :**

- 750 ml apa distilata
- 150 ml etanol pur
- 100 ml Tris/CAPS (10x)

Omogenizati. Solutia nu se poate pastra.



## 5.2.4 – IMUNOBLOTARE

### ● Solutie de spalare 1

Solutie TFS (1x) + 0,1% Tween® 20. **Prelucrarea completa a 1 membrana necesita aproximativ 500 ml:**

- 900 ml apa distilata
- 100 ml TFS (10x)
- 1 ml Tween® 20

Omogenizati temeinic. Solutia se poate pastra peste noapte la +2°C/+8°C.

### ● Solutie de spalare 2

Solutie TFS (1x). **Prelucrarea completa a 1 membrana necesita aproximativ 100 ml:**

- 900 ml apa distilata
- 100 ml TFS (10x)

Solutia trebuie pastrata la temperatura camerei (+18°C to +30°C) peste noapte.

### ● Solutia de blocare

Solutia de blocare se prepara pe durata etapei de transfer, diluand solutia BI in proportie de 1/10 cu solutie de spalare 1. **Pentru 1 membrana sunt necesari 20 ml de solutie de blocare de lucru 1x.**

- 18 ml solutie de spalare 1
- 2 ml solutie de blocare (10x)

Se omogeneaza prin rasturnarea eprubetei.

### ● Anticorpi primari diluati

Solutia se prepara chiar inainte de utilizare, prin diluarea anticorpilor primari 1/10 in solutie de spalare 1. **Pentru 1 membrana sunt necesari aproximativ 15 ml:**

- 13,5 g solutie de spalare 1
- 1,5 ml Anticorpi primary (10x)

Omogenizati prin rasturnarea tubului.

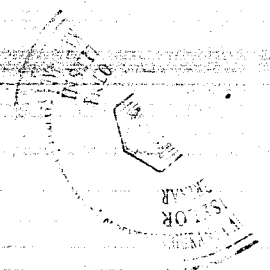
### ● Anticorpi secundari diluati (conjugat)

Chiar inainte de utilizare, diluati amestecul de anticorpi primari in proportie 1/10 in solutia de spalare 1. **Pentru 1 membrana sunt necesari 20 ml de amestec diluat:**

- 18 ml solutie de spalare 1
- 2 ml anticorpi secundari (10x)

Omogenizati prin rasturnarea tubului.





● **ECL**

Substratul (ECL) trebuie preparat chiar inainte de folosire. **Pentru 1 membrana este suficient 1 ml de substrat.**

- 0,5 ml Reagent 1
- 0,5 ml Reagent 2

Omogenizati solutia.

● **Solutia de dezvoltare**

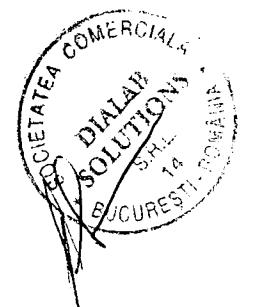
- 800 ml apa distilata
- 200 ml produs de dezvoltare

Solutia se poate pastra la temperatura camerei (+18°C la +30°C), intr-o camera obscura timp de maxim 15 zile.

● **Solutia fixatoare**

- 800 ml apa distilata
- 200 ml produs fixativ

Solutia se poate pastra la temperatura camerei (+18°C la +30°C), intr-o camera obscura timp de maxim 15 zile.



## 5.3 – PURIFICAREA PROBELOR

TeSeE™ WESTERN BLOT se poate efectua direct din omogenatul de proba (tub de omogenizare) preparat cu ocazia testului rapid TeSeE Bio-Rad de screening.

### Prelevarea probelor

**Pentru tesuturi periferice (ganglioni limfatici) introduceti 1 sfera medie (Cod: 3551171) in tubul de omogenizare, inainte de a adauga proba de tesut.**

Cantarii o cantitate de 350 mg ± 40 mg de tesut nervos (de preferat din aria obexului) sau 200 ± 20 mg de tesut periferic. Introduceti proba in eprubeta de omogenizare (grinding tube) , inchideti bine si treceti la etapa de omogenizare folosind omogenizatoarele tip Ribolyser®, TeSeE Precess 48™ sau TeSeE Precess 24™.

### Omogenizarea probelor

Introduceti tuburile in locasurile din omogenizator.

Efectuati un ciclu de agitare cu urmasorii parametri programati pe instrument.

	Ribolyser®		TeSeE Precess 48™ sau TeSeE Precess 24™	
	Tesut nervos	Tesut periferic	Tesut nervos	Tesut periferic
Time (Timp de omogenizare)	45	2 x 45 <sup>(1)</sup>	-	-
Speed (Viteza de vibratie)	6.5	6.5	-	-
Program	-	-	Program 1	Program 2

Daca omogenizarea nu este satisfacatoare, se pot repeta ciclurile de omogenizare, de 1-2 ori<sup>(2)</sup>.

<sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> Asteptati 5 minute intre 2 cicluri de agitare.

### Calibrarea probelor

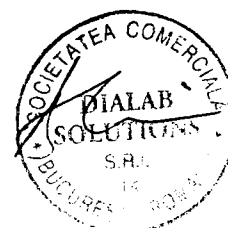
Scoateti tuburile de omogenizare din aparat, resuspendati omogenatul prin rasturnarea tubului inainte de a-l deschide, deschideti tubul si aspirati 500 µl cu seringa de calibrare, avand grija sa scufundati acul sub sferele de ceramica pentru a evita aspirarea fragmentelor de tesut prost omogenizate.

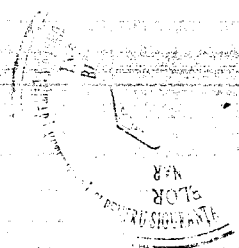
Transferati fiecare 500 µl de proba in cate o eprubeta Eppendorf de 2 ml.

*Nota:* In aceasta etapa, atat tuburile de omogenizare dupa procesul de omogenizare cat si eprubetele cu proba calibrata se pot pastra inchise:

- La temperatura camerei (+18°C/+30°C) timp de 15 ore.
- La +2°C/+8°C timp de 72 ore.
- La -20°C timp de 1 an. Probele congelate trebuie decongelate la temperatura camerei (+18°C/+30°C).

Probele se pot congela/decongela de maxim 3 ori. Inainte de utilizare, probele trebuie intotdeauna omogenizate prin inversare dupa ce s-au dezghetat complet.





### **Tratarea cu Proteinaza K**

Distribuiti cate 500 µl de solutie de Proteinaza K de lucru (a se vedea paragraful 5.2.1) in fiecare eprubeta de testare.

Omogenizati tuburile inchise prin rasturnare de 10 ori si incubati la  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  intr-o baie uscata termostata (heating block) timp 10 minute.

### **Precipitarea PrP<sup>res</sup> cu reactiv B**

Scoateti tuburile din termobloc. Deschideti-le si pipetati cate 500 µl de reactiv B in fiecare. Omogenizati prin rasturnare pana la obtinerea unei culori uniforme.

### **Concentrarea PrP<sup>res</sup> prin centrifugare**

Centrifugati tuburile timp de 7 minute la  $15000 \times g$  la  $20^{\circ}\text{C}$ .

### **Clarificarea probelor**

Aruncati supernatantul prin rasturnarea tuburilor deasupra unui container de deseuri, apoi uscati tuburile asezandu-le cu gura in jos pe hartie absorbanta timp de 5 minute.

Pipetati cate 100 µl de solutie Laemmli (a se vedea in paragraful 5.2.1) in fiecare eprubeta.

Incubati 5 minute la temperatura camerei ( $+18^{\circ}\text{C}/+30^{\circ}\text{C}$ ).

Resolubilizati complet precipitatul prin aspirare/respingere cu o pipeta.

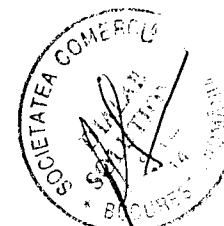
Incubati 5 minute la  $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  in baie uscata termostata (termobloc).

Scoateti tuburile de la incubare, omogenizati prin vortexare.

Centrifugati tuburile timp de 15 minute la  $15000 \times g$  la  $20^{\circ}\text{C}$ .

Transferati supernatantul intr-o noua eprubeta Eppendorf. Aruncati eprubeta cu precipitat.

In aceasta etapa, supernatantul se poate pastra inghetat la  $-20^{\circ}\text{C}$  timp de 24 de ore; probele trebuie apoi decongelate si aduse la temperatura camerei ( $+18^{\circ}\text{C}/+30^{\circ}\text{C}$ ) inainte de utilizare.



## 5.4 – ELECTROFOREZA

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT se poate folosi atat pentru confirmarea probelor suspecte pozitive EST cat si pentru identificarea tipului EST la oaie.

Procedeeul ce urmeaza se aplica pentru confirmarea probelor suspecte pozitive EST. Pentru instructiunile de lucru in caz de identificare de tip EST va rugam sa luati legatura cu un reprezentant Bio-Rad.

### Pregatirea gelului

Introduceti gelurile de acrilamida in tancul de migrare (a se vedea paragraful 5.2.2). Turnati tamponul de migrare (a se vedea paragraful 5.2.2) in tancul de electroforeza, de fiecare latura a gelurilor, pana la partea superioara a godeurilor. Scoateti pieptenii cu grija si clatiti fiecare godeu cu tampon de migrare, folosind o pipeta.

### Incarcarea probelor

Incalziti probele 4 minute la  $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  chiar inainte de incarcarea a 15  $\mu\text{l}$ /godeu. Incarcati cate 15  $\mu\text{l}$  din fiecare proba in godeurile atribuite conform schemei. Incarcati un godeu cu 15  $\mu\text{l}$  de standard precolorat Kaleidoscope si un altul cu 15  $\mu\text{l}$  de MagicMark™ diluat (a se vedea paragraful 5.2.2).

Nota: In cazul in care migrati mai multe geluri in acelasi timp, asigurati-va ca ati plasat controalele in pozitii diferite (godeuri cu alte numere) pentru identificarea usoara ulterioara a gelurilor.

### Migrarea diferentiala a probelor

Migrati gelul la temperatura camerei ( $+18^{\circ}\text{C}/+30^{\circ}\text{C}$ ) timp de 90 minute la 150 V. Linia albastra trebuie sa iasa din gel.

## 5.5 – TRANSFERUL PROTEINELOR

*Tamponul de transfer trebuie preparat inainte de terminarea perioadei de migrare a probelor (a se vedea la paragraful 5.2.3).*

### Pregatirea transferului proteinelor

Taiati membrana la dimensiunile gelului. La manipularea membranei folositi intotdeauna o penseta de plastic. Nu atingeti membrana cu mana. Imersati membrana 15 secunde in etanol pur, clatiti cu apa timp de 5 minute, apoi imersati in tampon de transfer timp de 10 minute. Scoateti gelul cu grija dintre placile de sticla si lasati-l la echilibrat timp de 10 minute in tampon de transfer.



### Pregatirea sandwichului cu gel

Inmuiati hartia de filtru si tamponele fibroase pentru transfer in tampon de transfer. Deschideti caseta de transfer, mentinand catre stanga latura transparenta. Asezati pe rand pe latura transparenta un tampon fibros, o bucata de hartie de filtru, membrana\* si gelul\*.

Completati cu hartie de filtru si celalalt tampon fibros si inchideti caseta.

Imersati caseta in tancul de transfer, umplut in prealabil cu tampon de transfer pana la limita indicata.

\*Indepartati bulele de aer la fiecare strat adaugat folosind o pipeta de sticla sau o rola adecvata.

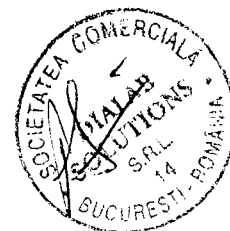
Nota: In caz ca prelucrati mai multe membrane odata, marcati corespunzator fiecare membrane intr-un colt.

### Transferul pe membrana PVDF

Agitati pe durata transferului cu ajutorul unei bare magnetice si agitator magnetic si transferati 60 minute la 115 V.

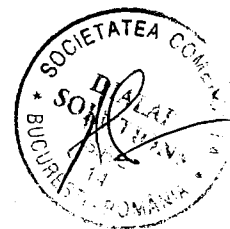
## 5.6 – IMUNOBLOTAREA

- a) Dupa terminarea transferului proteinelor, deschideti ansamblul de blotare si scoateti membrana pentru dezvoltare. Imersati rapid membrana in Solutie de spalare 2 (a se vedea paragraful 5.2.4), apoi plasati-o in etanol 10 secunde, apoi clatiti-o 5 minute in apa distilata.  
*Nota:* in aceasta etapa, membrana se poate pastra peste noapte in apa distilata, la o temperatura de +2°C/+8°C
- b) Eliminati apa distilata si incubati membrana timp de 30 minute in solutie de blocare (paragraful 5.2.4). Incubati cu agitare medie. **20 ml sunt suficienti pentru 1 membrana.** Nota: din aceasta etapa si pana la etapa g), se poate folosi Bio-Rad Western Processor pentru toate etapele de agitare si de spalare (setarile se gasesc in manualul de instructiuni).
- c) Eliminati solutia de blocare si incubati membrana in **anticorpi primari** diluati (paragraful 5.2.4) timp de 30 minute la temperatura camerei (+18°C / +30°C) cu agitare medie. **Pentru 1 membrana sunt necesari 15 ml de anticorpi primary diluati.**
- d) Eliminati solutia de anticorpi primari si clatiti rapid membrana cu Solutie de spalare 1, apoi spalati-o de doua ori, odata 5 si odata 10 minute, cu agitare rapida. **Pentru fiecare ciclu de spalare si 1 membrana sunt necesari 50 ml de solutie de spalare 1.**





- e) Eliminati solutia de spalare 1 si incubati membrana 20 minute in **anticorpi secundari diluati** (paragraf 5.2.4) la temperatura camerei (+18°C / +30°C) cu agitare medie. **20 ml de anticorpi secundari diluati sunt suficieni pentru 1 membrana.**
- 
- f) Scurgeti solutia de anticorpi secundari si apoi, folosind solutie de spalare 1, clatiti scurt, apoi spalati respectiv 5, 10 si 10 minute cu agitare rapida. **Pentru 1 membrana si 1 ciclu se folosesc 50 ml de solutie de spalare 1.**
- g) Plasati membrana in 50 ml solutie de spalare 2, cu agitare usoara.
- h) Scurgeti membrana pe hartie absorbanta fara a o presa si introduceti-o in mapa de plastic.
- i) Adaugati reactivul ECL (paragraf 5.2.4). Eliminati excesul de reactiv ECL si bulele de aer cu hartie absorbanta. Puneti totul intr-o caseta de expunere.
- j) In camera obscura acoperiti mapa cu un film si expuneti 15 minute. Filmul se poate expune mai mult sau mai putin, regland perioada pentru a obtine semnalul optim.
- k) Imersati filmul in solutia de developare 45 secunde (paragraful 5.2.4). Clatiti in apa distilata. Imersati filmul in solutie fixatoare pana cand filmul devine complet transparent.
- l) Spalati cu apa distilata si lasati filmul sa se usuce la aer.



## 6 – PROCEDEUL DE TESTARE CU GEL CRITERION™ XT

### 6.1 – REACTIVI SI MATERIALE NECESARE

#### 6.1.1 – REACTIVI SI CONSUMABILE

Pipete gradate (5, 10, 25 ml), eprubete conice (50 ml), eprubete Eppendorf de polipropilena de 2 ml cu capac.

Film de tip PARAFILM®M.

#### **Purificarea probelor**

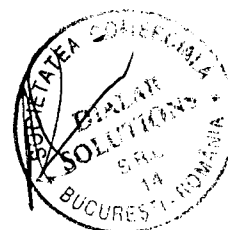
Laemmlli sample buffer	30 ml	Bio-Rad, cod 161-0737
2-Mercaptoetanol	25 ml	Bio-Rad, cod 161-0710
SDS	100 g	Bio-Rad, cod 161-0301
Seringi de calibrare	200	Bio-Rad, cod 3551174

#### **Electroforeza gel**

Criterion™ XT 12 % Bis-Tris	1 gel/18 godeuri	Bio-Rad, cod 345-0118
XT-MOPS (tampon migrare) (20 x)	500 ml	Bio-Rad, cod 161-0788
Standard Kaleidoscope precolorat	500 µl	Bio-Rad, cod 161-0324
MagicMark™ XP Western Standard (standard de masa moleculara)	250 µl	Invitrogen, cod LC5602

#### **Imunoblotare**

Etanol (Normapur)	1L	VWR, cod 20821-296
Tris/CAPS (tampon de transfer) (10x)	1L	Bio-Rad, cod 161-0778
Hartie de Filtru (hartie de transfer Criterion™ XT pt gel gata turnat)	50 bucati	Bio-Rad, cod 170-4085
Membrana PVDF (0.2 µm)	10 bucati	Bio-Rad, cod 162-0175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, cod 170-6531
TFS (tampon de spalare) (10x)	1 L	Bio-Rad, cod 161-0780
ECL (substrat pt conjugat)	125 ml	Amersham, cod RPN2109
ECL Hyperfilms (18 x 24 cm)	25 films	Amersham, cod RPN2103K
Development folders	30 bucati	Applied Biosystems, cod T2258
Developing solution LX24	pt 20 L	VWR sau Kodak
Fixative solution AL4	pt 20 L	VWR sau Kodak



## 6.1.2 – ECHIPAMENT

Pipete reglabile (10, 40, 200, 1000 µl).

Cilindri gradati (1L si 2L).

Pensa de plastic, tavite, vortex.

Caseta de expunere si camera obscura pentru dezvoltare.

### **Purificare probe**

---

TeSeE Precess 48™ Bio-Rad, cod 3580200

TeSeE Precess 24™ Bio-Rad, cod 3581070

Heater block (3 blocuri) Bio-Rad, cod 3589057

Blocuri pt Heater block de 20 locuri Bio-Rad, cod 3589072

Centrifuga - 220/240 V Bio-Rad, cod 3581396

Rotor vertical (Drum rotor) Bio-Rad, cod 3589189

Adaptoare Rotor (x6) Bio-Rad, cod 3589191

### **Electroforeza in gel**

---

Criterion™ XT Cell Bio-Rad, cod 165-6001

PowerPac HC power supply 220/240 V Bio-Rad, cod 164-5052

### **Transfer**

---

Criterion™ XT blotter Bio-Rad, cod 170-4070

### **Imunoblotare**

---

Western Processor baza Bio-Rad, cod 3580098

Western Processor Criterion™ XT kit Bio-Rad, cod 170-3985



## 6.2 – PREPARAREA REACTIVILOR

### 6.2.1 – PURIFICAREA PROBELOR

#### ● **Proteinaza K**

Solutie de proteinaza K diluatae in reactiv A :

- 1 ml Buffer A
- 20 µl Proteinase K

Amestecati bine prin rasturnare pentru a obtine o solutie omogena. Dupa reconstituire, proteinaza K diluata este stabile 10 ore la temperatura camerei (+18°C la +30°C).

#### ● **Solutia Laemmli**

Solutie de DS + 2-Mercaptoetanol + Laemmli:

- 0,6 g SDS
- 1,5 ml 2-Mercaptoethanol

Amestecati prin rasturnare.

- 28,5 ml tampon Laemmli pur pentru probe

Solutia se portioneaza in alicote de 4 ml si se pastreaza la -20°C. Alicotele decongelate se pot recongela.

Nota: Se recomanda prepararea solutiei Laemmli cu 1 ora inainte de utilizare, permitand dizolvarea completa a SDS.

### 6.2.2 – ELECTROFOREZA

#### ● **Standard precolorat Kaleidoscope**

Standardul Kaleidoscope se prepara pe durata denaturarii probelor, inainte de incarcarea in gelul de acrilamida. Preparati o dilutie 1/12 in Laemmli, de exemplu 10 µl de standard Kaleidoscope + 110 µl de solutie Laemmli. Consultati prospectul de utilizare al markerului pentru conditiile de pastrare.

#### ● **MagicMark™ XP Western Standard**

Markerul de masa moleculara MagicMark™ XP se prepara in timpul denaturarii probelor inainte de incarcarea in gelul de acrilamida.

Preparati o dilutie 1/12 in solutie Laemmli, de exemplu 10 µl de MagicMark™ XP + 110 µl de solutie Laemmli.

Consultati prospectul de utilizare MagicMark™ XP pentru conditiile de pastrare.

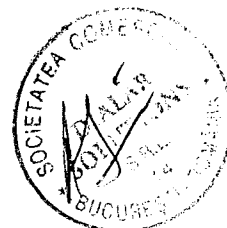
#### ● **Tampon de migrare Criterion™ XT**

Solutie de MOPS (1x).

Preparati o dilutie 1/20. Pentru 1 tanc preparati 1 L de tampon diluat:

- 950 ml apa distilata
- 50 ml tampon MOPS (20x)

Omogenizati. Solutia nu poate fi pastrata diluata.



### 6.2.3 – TRANSFERUL PROTEINELOR

#### ● Tampon de transfer

Solutie de Tris/CAPS-Etanol 15%. **Pentru 1 tanc de migrare preparati 2 L.**

- 750 ml apa distilata
- 150 ml etanol pur
- 100 ml Tris/CAPS (10x)

Omogenizati. Solutia nu poate fi pastrata diluata.

### 6.2.4 – IMUNOBLOTAREA

#### ● Solutia de spalare 1

Solutie de TFS (1x) + 0,1% Tween<sup>®</sup> 20. **Pentru prelucrarea completa a 1 membrana este necesar aproximativ 1 L.**

- 900 ml apa distilata
- 100 ml TFS (10x)
- 1 ml Tween<sup>®</sup> 20

Omogenizati foarte bine. Solutia se poate pastra peste noapte la +2°C/+8°C.

#### ● Solutia de spalare 2

Solutie de TFS (1x). **Pentru prelucrarea completa a 1 membrana sunt necesari aproximativ 200 ml.**

- 900 ml apa distilata
- 100 ml TFS (10x)

Solutia se poate pastra peste noapte la +18°C/+30°C.

#### ● Solutia de blocare

Solutia de blocare BI se dilueaza 1/10 cu Solutie de spalare 1 in timpul etapei de transfer. **Pentru prelucrarea completa a 1 membrana sunt necesari 40 ml de solutie de blocare.**

Adaugati intr-un tub de 50 ml:

- 36 ml solutie de spalare 1
- 4 ml solutie de blocare BI (10x)

Omogenizati prin rasturnarea tubului.

#### ● Anticorpi primari diluati

Preparati solutia chiar inainte de utilizare prin diluare 1/10 in Solutia de spalare 1. **Pentru 1 membrana sunt necesari 30 ml de anticorpi diluati.**

- 27 ml solutie de spalare 1
- 3 ml anticorpi primari (10x)

Omogenizati prin rasturnare.



**• Anticorpi secundari diluati (conjugat)**

Se prepara chiar inainte de utilizare prin diluare 1/10 in Solutia de spalare 1.  
**Pentru 1 membrana sunt necesari 40 ml de anticorpi secundari diluati.**

- 36 ml solutie de spalare 1
- 4 ml anticorpi secundari (10x)

Omogenizati prin rasturnare.

**• ECL**

Substratul (ECL) trebuie pregatit chiar inainte de utilizare. **Pentru 1 membrana aveti nevoie de 2 ml de substrat.**

- 1 ml Reagent 1
- 1 ml de Reagent 2

Omogenizati.

**• Solutie de dezvoltare**

- 800 ml apa distilata
- 200 ml produs de dezvoltare

Solutia se poate pastra la temperatura camerei (+18°C la +30°C), intr-o camera obscura, maxim 15 zile.

**• Solutie fixatoare**

- 800 ml apa distilata
- 200 ml produs Fixativ

Solutia se poate pastra la temperatura camerei (+18°C la +30°C), intr-o camera obscura, maxim 15 zile.



## 6.3 – PURIFICAREA PROBELOR

TeSeE™ WESTERN BLOT se poate efectua direct din omogenatul de proba (tub de omogenizare) preparat cu ocazia testului rapid TeSeE™ Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).

### Prelevarea probelor

**Pentru tesuturi periferice (ganglioni limfatici) introduceti 1 sfera medie (Ref.: 3551171) in tubul de omogenizare, inainte de adaugarea probei.**

Cantarii 350 mg ± 40 mg de tesut nervos (de preferat din obex) sau 200 mg ± 20 mg de tesut periferic. Introduceti proba in tubul de omogenizare, inchideti capacul bine si treceti la etapa de omogenizare (Ribolyser® sau TeSeE Precess 48™ sau TeSeE Precess 24™).

### Omogenizarea probelor

Introduceti tuburile in locasurile din omogenizator.

Efectuati un ciclu de agitare cu urmatorii parametri programati pe instrument.

	Ribolyser®		TeSeE Precess 48™	
	Tesut nervos	Tesut periferic	Tesut nervos	Tesut periferic
Time (Timp de omogenizare)	45	2 x 45 <sup>(1)</sup>	-	-
Speed (Viteza de vibratie)	6.5	6.5	-	-
Program	-	-	Program 1	Program 2

Daca omogenizarea nu este satisfacatoare, se pot repeta ciclurile de omogenizare, de 1-2 ori<sup>(2)</sup>.

<sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> Lasati un interval de 5 minute intre 2 cicluri de omogenizare.

### Calibrarea probelor

Scoateti tuburile de omogenizare din aparat, resuspendati omogenatul prin rasturnarea tubului inainte de a-l deschide, deschideti tubul si aspirati 500 µl cu seringa de calibrare, avand grija sa scufundati acul sub sferele de ceramica pentru a evita aspirarea fragmentelor de tesut prost omogenizate.

Transferati fiecare 500 µl de proba intr-o eprubeta Eppendorf de 2 ml.

*Nota:* In aceasta etapa, atat tuburile de omogenizare dupa procesul de omogenizare cat si eprubetele cu proba calibrata se pot pastra inchise:

- La temperatura camerei (+18°C/+30°C) timp de 15 ore.
- La +2°C/+8°C (in gheata sau in frigider) timp de 72 ore.
- La -20°C timp de 1 an. Probele congelate trebuie decongelate la temperatura camerei (+18°C/+30°C).



Probele se pot congela/decongela de maxim 3 ori. Inainte de utilizare, probele trebuie intotdeauna omogenizate prin inversare de 10 ori dupa ce s-au dezghetat complet.

### **Tratarea cu Proteinaza K**

Distribuiti cate 500 µl de solutie de Proteinaza K de lucru (a se vedea paragraful 6.2.1) in fiecare eprubeta de testare.

Omogenizati tuburile inchise prin rasturnare de 10 ori si incubati la 37°C ± 2°C intr-o baie uscata termostata (heating block) timp 10 minute.

### **Precipitarea PrP<sup>res</sup> cu reactiv B**

Scoateti tuburile din termobloc. Deschideti-le si pipetati cate 500 µl de reactiv B in fiecare. Omogenizati prin rasturnare pana la obtinerea unei culori uniforme.

### **Concentrarea PrP<sup>res</sup> prin centrifugare**

Centrifugati tuburile timp de 7 minute la 15000 x g la 20°C .

### **Clarificarea probelor**

Aruncati supernatantul prin rasturnarea tuburilor deasupra unui container de deseuri, apoi uscati tuburile asezandu-le cu gura in jos pe hartie absorbanta timp de 5 minute.

Pipetati cate 100 µl de solutie Laemmli (a se vedea in paragraful 6.2.1) in fiecare eprubeta.

Incubati 5 minute la temperatura camerei (+18°C/+30°C).

Resolubilizati complet precipitatul prin aspirare/respingere cu o pipeta.

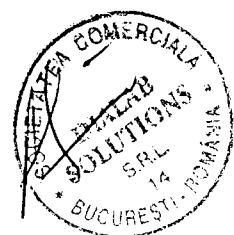
Incubati 5 minute la 100°C ± 5°C in baie uscata termostata.

Scoateti tuburile de la incubare, omogenizati prin vortexare.

Centrifugati tuburile timp de 15 minute la 15000 x g la 20°C.

Transferati supernatantul intr-o noua eprubeta Eppendorf. Aruncati eprubeta cu precipitat.

In aceasta etapa, supernatantul se poate pastra inghetat la -20°C timp de 24 de ore; probele trebuie apoi decongelate si aduse la temperatura camerei (+18°C/+30°C) inainte de utilizare.





## 6.4 – ELECTROFOREZA

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT se poate utiliza atat pentru confirmarea probelor suspectate ca pozitive EST cat si pentru tipizarea susei EST.

Procedeul urmat se aplica in scopul confirmarii probelor suspectate ca pozitive EST. Va rugam sa luati legatura cu un reprezentant Bio-Rad pentru instructiunile de utilizare in cazul in care se doreste identificarea (tipizarea) susei EST.

### Prepararea gelului

Indepartati banda de plastic de la partea inferioara a placii de plastic si introduceti gelurile de acrilamida (paragraful 6.2.2) in tancul de migrare. Turnati tamponul de migrare (paragraful 6.2.2) in tancul de electroforeza de fiecare parte a gelurilor pana la partea superioara a godeurilor. Scoateti pieptenii cu atentie si clatiti fiecare godeu cu tampon de migrare, folosind o pipeta.

### Incarcarea probelor

Incalziti probele 4 minute la  $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  chiar inainte de a incarca cate 15  $\mu\text{l}$ /godeu.

Incarcati 15  $\mu\text{l}$  de standard precolorat Kaleidoscop diluat si 15  $\mu\text{l}$  de standard MagicMark™ diluat (paragraful 6.2.2).

Nota: In caz ca migrati mai multe geluri in acelasi timp, asigurati-va ca plasati controalele in godeuri/linii diferite, pentru a le putea identifica ulterior.

### Migrarea diferentiala a probelor

Migrati gelul la temperatura camerei ( $+18^{\circ}\text{C}$  la  $+30^{\circ}\text{C}$ ) timp de 50 minute la 200 V.

## 6.5 – TRANSFERUL PROTEINELOR

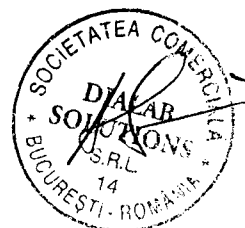
*Tamponul de transfer trebuie preparat inainte de terminarea perioadei de migrare a probelor (paragraful 6.2.3).*

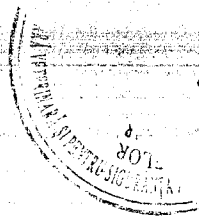
### Pregatirea transferului proteinelor

Taiati membrana la dimensiunile gelului. Folositi intotdeauna o penseta de plastic la manipularea membranei de blotare.

Imersati membrana in etanol pur timp de 15 secunde, clatiti cu apa distilata 5 minute, apoi 10 minute cu tampon de transfer.

Scoateti cu grija gelul din caseta de plastic si echilibrati-l 10 minute in tampon de transfer.





### Prepararea sandwichului cu gel

Inmuiati hartie de filtru si tamponele fibroase de blotare in tampon de transfer. Deschideti caseta de transfer, cu latura rosie catre stanga. Asezati pe rand pe latura rosie un tampon fibros inmuiat, o hartie de filtru, membrana\* si apoi gelul\*. Completati cu o alta hartie de filtru, apoi al 2-lea tampon fibros si inchideti caseta. Imersati-o in tancul de transfer, umplut in prealabil cu tampon de transfer pana la nivelul indicat. Se adauga o bricheta de congelare inghetata in prealabil (pinguin), inainte de a umple complet tancul.

\*Indepartati bulele de aer la adaugarea fiecarui strat.

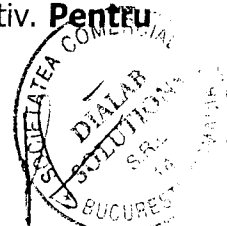
Nota: In caz ca prelucrati mai multe membrane odata, marcati-le pe fiecare intr-un colt pentru identificare.

### Transferul pe membrana PVDF

Agitati pe durata transferului cu ajutorul unui dispozitiv cu bara magnetica si migrati 60 minute la 115 V.

## 6.6 – IMUNOBLOTAREA

- a) Dupa terminarea transferului proteinelor, deschideti ansamblul de blotare si scoateti membrana in vederea dezvoltarii. Scufundati-o rapid in Solutia de spalare 2, apoi in etanol timp de 10 secunde, apoi in apa distilata 5 minute. Nota: in aceasta etapa membrana poate fi pastrata peste noapte in apa distilata, la +2°C/+8°C.
- b) Eliminati excesul de apa distilata si incubati membrana 30 minute in solutie de blocare (paragraful 6.2.4). Incubati cu agitare medie. **40 ml sunt suficienti pentru 1 membrana.**  
Nota: de la aceasta etapa si pana la etapa g), se poate folosi aparatul Bio-Rad Western Processor atat pentru agitare cat si pentru etapele de spalare (a se consulta manualul acestuia pentru setarea parametrilor).
- c) Eliminati solutia de blocare si incubati membrana in anticorpi primari diluati (paragraful 6.2.4) timp de 30 minute la temperatura camerei (+18°C la +30°C) cu agitare medie. **Pentru 1 membrana sunt necesari 30 ml de anticorpi primari diluati.**
- d) Eliminati excesul de anticorpi primari si clatiti rapid membrana cu Solutie de spalare 1, apoi spalati-o de 2x, odata 5 minute si a doua oara 10 minute, cu agitare rapida. **Pe fiecare ciclu de spalare a 1 membrana sunt necesari cate 100 ml de solutie de spalare 1.**
- e) Eliminati excesul de solutie de spalare 1 si incubati membrana 20 minute in anticorpi secundari diluati (a se vedea in paragraful 6.2.4) la temperatura camerei (+18°C/+30°C) cu agitare medie. **Pentru 1 membrana sunt necesari 40 ml de anticorpi secundari diluati.**
- f) Eliminati excesul de anticorpi secundari si folosind Solutie de spalare 1, clatiti rapid cu agitare rapida timp de 5, 10 si 10 minute respectiv. **Pentru**



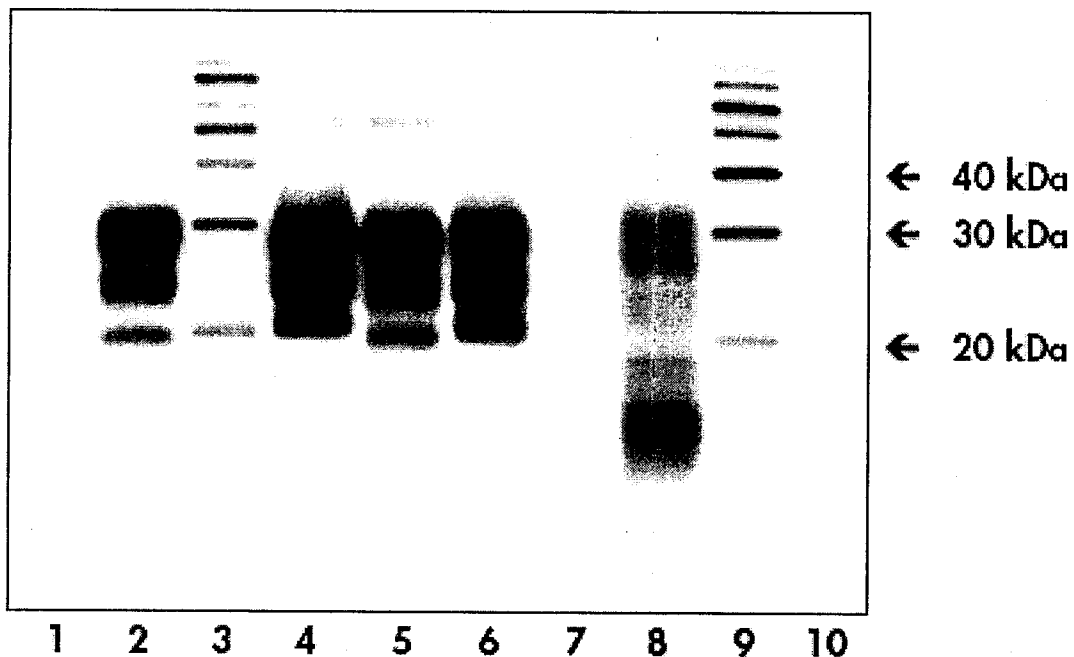
**fiecare ciclu de clătire a 1 membrana sunt necesari 100 ml de soluție de spălare 1.**

- g) Introduceți membrana în 100 ml de Soluție de spălare 2 cu agitare moderată.
- h) Scurgeți membrana fără a o apăsa pe hârtie absorbantă, și introduceți-o într-o mapă de plastic.
- i) Adăugați reactivul ECL (paragraful 6.2.4). Eliminați excesul de reactiv ECL și bulele de aer cu ajutorul unei hârtii absorbante. Introduceți în caseta de expunere
- j) În camera obscură, acoperiți mapă cu un film și expuneți timp de 15 minute. Filmul se poate expune mai mult sau mai puțin, atât cât se apreciază ca asigură un semnal optim.
- k) Îmersați filmul în soluție de dezvoltare 45 secunde (paragraful 6.2.4). Clătiți cu apă distilată. Îmersați filmul în soluția fixatoare până când acesta devine complet transparent. Spălați cu apă și lăsați filmul la uscat.
- l) Spălați filmul cu apă distilată și lăsați-l să se usuce.



## 7 – INTERPRETAREA REZULTATELOR

Figura 1 prezinta profilul benzilor probelor EST negative, probe EST pozitive la diferite specii animale si controlul de masa moleculara (pozitiile 3 si 9).



**Probele Negative** (pozitiile 1 si 10) au fost tratate cu proteinaza K. Acestea nu arata nici un semnal, deoarece PrP<sup>c</sup> a fost complet digerata.

**Probele Pozitive** au fost de asemenea tratate cu proteinaza K.

**Proba de bovina pozitiva ESB** (pozitia 2), **proba pozitiva de scrapie clasica** (pozitia 6) si **proba pozitiva MCC** (pozitia 4) arata un profil tipic cu 3 benzi, demonstrand digestia PrP<sup>c</sup> si transformarea proteinei prionice specifice de boala intr-un fragment rezistent la proteinaza cu masa moleculara redusa prin indepartarea capatului N-terminal al proteinei. Cele 2 benzi superioare corespund formelor mono- si di-glicozilate (27-30 kDa) in timp ce banda inferioara corespunde formei neglicozilate.

**Proba de ovina infectata experimental cu ESB** (pozitia 5) prezinta un semnal mai intens la banda di-glicozilata fata de cea mono-glicozilata. Totusi, acest profil de glicozilare nu se poate considera ca dovada suficienta de infectie a animalului cu ESB. In conformitate cu recomandarile Laboratorului Comunitar de Referinta (CRL), in cazul acestui tip de probe trebuie efectuat testul diferential pentru a avea posibilitatea de a decide daca este scrapie sau ESB. Pentru

aceasta folositi Testul Bio-Rad Discriminatory kit. Va rugam sa contactati un reprezentant Bio-Rad pentru mai multe informatii despre testul Bio-Rad de Discriminare.

**Proba de ovina afectata de scrapie atipica, de ex. Nor98** (pozitia 8) se prezinta cu profil atipic de glicozilare. Este vizibila o banda joasa la aproximativ 12 kDa, in timp ce benzile superioare nu sunt in aceleasi pozitii comparativ cu cazurile de scrapie "tipice". Semnalul este de asemenea mai intens la banda inferioara fata de banda superioara.

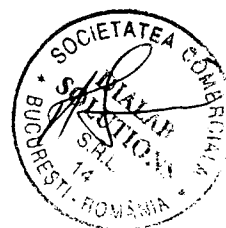
Citirea gelului trebuie considerata cu prudenta deoarece o proba intens pozitiva detectata cu TeSeE™ WESTERN BLOT poate masca probele adiacente negative sau slab pozitive.

### **Limitele testului:**

Un rezultat negativ inseamna ca proba testata nu contine PrP<sup>res</sup> detectabila la testarea cu trusa TeSeE™ WESTERN BLOT. Totusi, deoarece nivelurile foarte mici de PrP<sup>res</sup> ar putea fi nedetectabile, un rezultat negativ nu exclude posibilitatea unei infectii.

Orice proba cu rezultat negativ conform criteriilor de interpretare a testului TeSeE™ WESTERN BLOT, dar pozitiva printr-un test rapid pentru EST trebuie testata folosind una dintre celelalte metode de confirmare certificate de catre OIE, imunohistochimie (IHC) sau SAF-Imunoblot.

Orice proba cu rezultat pozitiv reproductibil, in conformitate cu criteriile de interpretare ale testului trebuie verificata conform reglementarilor legale in vigoare.

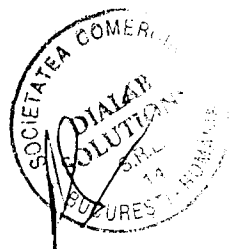




## 8 – PRECAUTII

Calitatea datelor obtinute depinde de aderarea la si respectarea urmatoarelor reguli ale Bunelor Practici de Laborator:

- Reactivii trebuie pastrati la temperatura adecvata (consultati indicatiile furnizorilor).
- Nu lucrati cu reactivi expirati.
- Nu mai folositi proteinaza K reconstituita dupa 10 ore de stocare la temperatura camerei (+18°C la +30°C).
- Nu amestecati si nu combinati reactivi proveniti din truse TeSeE™ WESTERN BLOT cu numere diferite de lot, cu exceptia eprubetelor de omogenizare, a reactivului A, reactivului B si proteinazei K.
- Permeteti reactivilor sa ajunga la temperatura camerei (+18°C/+30°C) cu 30 minute inainte de utilizare.
- Reconstituiti cu multa grija reactivii, avand grija sa nu-i contaminati.
- Nu efectuati testarea in prezenta vaporilor reactivi (acizi, baze, alcali, aldehide) sau praf, deoarece acestia altereaza activitatea enzimatica a conjugatului.
- Reactia enzimatica este foarte sensibila la prezenta oricaror metale sau ioni metalici. Prin umare, trebuie evitat contactul conjugatului cu elemente metalice.
- Folositi numai eprubete de polipropilena.
- Folositi sticlaria curata, clatita cu apa distilata, sau de preferinta vase de unica folosinta.
- Folositi pentru fiecare proba un varf nou de pipeta.
- La inceperea electroforezei si a transferului, verificati daca cei 2 electrozi vin in contact cu tamponul.
- Toti timpii de clatire indicati trebuie respectati intocmai, pentru a evita coloratia nedorita de fond la colorarea finala cu reactivul ECL.



## 9 – INSTRUCȚIUNI DE IGIENA/PROTECȚIA MUNCII

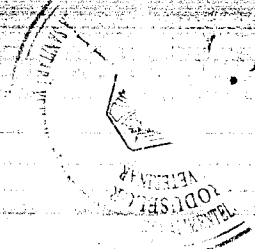
În general condițiile de igienă, biosecuritate și bunele practice de laborator trebuie să respecte recomandările autorității legale naționale.

- Toți reactivii trusei sunt destinați diagnosticului "in vitro".
- Purtați măști de protecție de unică folosință la manipularea reactivilor și a probelor și apoi spălați-vă mâinile.
- Nu pipetați cu gura.
- Utilizați containere de polipropilenă pentru a evita spargerea sticlei.
- Toate materialele care vin în contact direct cu probele și soluțiile de spălare trebuie considerate contaminate.
- Evitați stropirea cu probe sau soluții care conțin probe biologice.
- Suprafețele contaminate trebuie curățate cu soluție de hipoclorit de sodiu 20000 ppm (clor menajer). Dacă lichidul de contaminare este acid, suprafețele contaminate trebuie mai întâi neutralizate cu hidroxid de sodiu înainte de a le trata cu clor. Suprafețele trebuie apoi clătite cu apă distilată, uscate cu etanol și zăvântate cu hârtie absorbantă. Materialul folosit la curățenie trebuie aruncat în containerul de infecte.
- Probele, materialele și produsele contaminate trebuie eliminate după decontaminare:
  - fie prin înmuiere în hidroxid de sodiu 1 M (concentrația finală) timp de cel puțin 1 oră la temperatura camerei (+18°C/+30°C),
  - fie prin înmuiere în soluție de hipoclorit de sodiu 20000 ppm minim 1 oră la temperatura camerei (+18°C/+30°C),
  - fie prin autoclavare la 134°C minim 18 minute, la presiune de 3 bari.

**Nota: nu autoclavati niciodată soluții care conțin clor sau hipoclorit sau reactiv B.**

- Toate operațiile implicate de testarea de triere pentru Encefalopatia Spongiformă Transmisibilă (EST) se supun reglementărilor adecvate și trebuie efectuate în laboratoare cu acces limitat controlat dedicate în mod exclusiv acestei activități. Protecția operatorului trebuie asigurată prin purtarea halatului de laborator, a măștilor de protecție și a măștii cu vizor sau a ochelarilor de protecție.
- Operatorii trebuie să fie instruiți în mod adecvat asupra riscului la care sunt expuși la lucrul cu agenți EST sau prioni și cu modalitățile specifice de decontaminare a agenților infecțioși neconvenționali. Măsurile de biosecuritate trebuie să fie conforme cu recomandările autorității de reglementare din țara respectivă.
- Neutralizați și/sau autoclavati toate soluțiile de spălare sau orice alt lichid care conține probe biologice înainte de a le arunca.

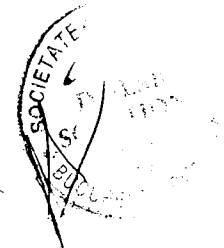




- Pentru recomandari referitoare la precauții și hazard legate de această trusă va rugăm să urmăriți pictogramele de pe etichetele reactivilor și informația furnizată la sfârșitul acestor instrucțiuni de utilizare. Fise de pericolozitate (MSDS) sunt disponibile pe site-ul [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com).

## 10 – BIBLIOGRAFIE

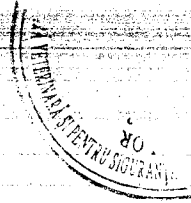
1. S.B. PRUSINER (1991) Molecular biology of prion diseases - Science 252:1515-1522.
2. J.B. KATZ, J.G. PEDERSEN, A.L. JENNY and W.D. TAYLOR (1992) Assessment of Western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE) - Journal of Veterinary Diagnostic Investigations, 4, 447-449.
3. G.A.H. WELLS, Y.I. SPENCER and M. HARITANI (1994) Configuration and topographic distribution of PrP in the central nervous system in bovine spongiform encephalopathy: an immunohistochemical study. In: Slow Infections of the Central Nervous System, J. BJORNSSON, R.I. CARP, A. LOVE and M. WISNIEWSKI - Eds The New York Academy of Sciences, pp 350-352.
4. J.P. DESLYS, E. COMOY, S. HAWKINS, S. SIMON, H. SCHIMMEL, G. WELLS, J. GRASSI and J. MOYNAGH (2001) Screening slaughtered cattle for BSE - Nature: 409; 476.
5. S. BENESTAD, P. SARRADIN, B. THU, J. SCHÖNHEIT, M. TRANULIS and B. BRATBERG (2003) Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of new type, Nor98. Veterinary Record 153, 202-208.
6. A. BUSCHMANN, G. LÜHKEN, J. SCHULTZ, G. ERHARDT and M.-H. GROSCHUP (2004) Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie resistant genotype (PrPARR/ARR). Journal of General Virology 85, 2727-2733.
7. L. ORGE, A. GALO, C. MACHADO, C. LIMA, C. OCHOA, J. SILVA, M. RAMOS and J.-P. SIMAS (2004) Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. Journal of General Virology 85, 3487-3491.
8. A. BUSCHMANN, A.-G. BIACABE, U. ZIEGLER, A. BENCSIK, J.-Y. MADEC, G. ERHARDT, G. LÜHKEN, T. BARON and M.-H. GROSCHUP (2004) Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. Journal of Virological Methods 117, 27-36.





9. H. DE BOSSCHERE, S. ROELS, S. BENESTAD, E. VANOPDENBOSCH (2004). Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Veterinary Record* 155(22): 707-8.
10. H. ONNASCH, H.M. GUNN, B.J. BRADSHAW, S. BENESTAD, H.F. BASSETT (2004). Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Veterinary Record* 155, 636-637
11. S. BENESTAD, P. SARRADIN, J-M. BILHEUDE, J. GRASSI, H. LAUDE, O. ANDREOLETTI, T. MOLDAL and B. BRATBERG. Are there gold standard methods for the diagnosis of TSE? Nor98 scrapie cases: atypical cases and their challenging diagnosis. Second International Chronic Wasting Disease Symposium, Madison, Wisconsin, USA
12. BIACABE, A-G., LAPLANCHE, J-L., RYDER, S. AND BARON, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion disease, *EMBO Reports* 5, 110-114
13. CASALONE, G., ZANUSSO, G., ACUTIS, P., FERRARI, S., CAPUCCI, I., TAGLIAVINI, F., MONACO, S. and CARAMELLI, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with Creutzfeld-Jakob disease. *PNAS* 101, 3065-70
14. BUSCHMANN A; GRETZSCHEL A; BIACABE A-G; SCHIEBEL K; CORONA C; HOFFMANN C; EIDEN M; BARON T; CASALONE C; GROSCHUP M.H (2006). Atypical BSE in Germany-proof of transmissibility and biochemical characterization. *Veterinary microbiology* 2006; 117(2-4); 103-16
15. ARSAC, J-N., ANDREOLETTI, O., BILHEUDE, J-M., LACROUX, C., BENESTAD, S. L. AND BAARON, T. (2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerging Infectious Diseases* 13(1), 58-65.
16. E. URO-COSTE, H. CASSARD, S. SIMON, S. LUGAN, J-M. BILHEUDE, A. PERRETLIAUDET, J.-W. IRONSIDE, S. HAIK, C. BASSET-LEOBON, C. LACROUX, K. PEOCH, N. STREICHENBERGER, J. LANGEVELD, M.-W. HEAD, J. GRASSI, J.-J. HAUW, F. SCHELCHER, M.-B. DELISLE, O. ANDREOLETTI (2008). Beyond PrP<sup>res</sup> Type 1/Type 2 Dichotomy in Creutzfeld-Jakob disease. *Plos. Pathogens* volume 4, issue 2, e1000029





X Jati



# ETICHETE




## I-BOX (Informații cutie)

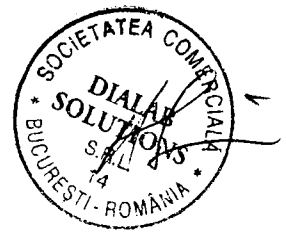
1 – Text tipărit pe cutie



Bio-Rad  
3, Boulevard Raymond Poincaré  
92430 Marnes-la-Coquette France  
Tel. : 33 (0) 1 47 95 60 00  
Fax. : 33 (0) 1 47 41 91 33  
www.bio-rad.com


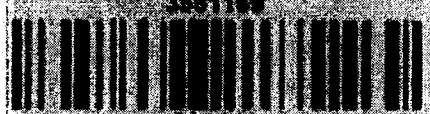
## 2 – Etichete de pe cutie

<b>TeSeE™ WESTERN BLOT</b>		<b>REF 35511</b>
REACTIVI PENTRU CONFIRMAREA <i>IN VITRO</i> A PROBELOR SUSPECTATE POZITIVE TSE		<b>IN VITRO T</b>
A	1 x 35 1 x 20 ml	Eprubete de omogenizare Soluție de denaturare
B	1 x 20 ml	Soluție de clarificare
PK	1 x 0,5 ml	Proteinaza K
Ab I	1 x 8 ml	Anti-PrP Mab. (10x)
Ab II	1 x 10 ml	IgG-HRP (10x) Oaie Anti-lepure
BI	1 x 10 ml	Soluție de blocare (10x)
  		<b>Pericol</b> H226 – H318 – H315 – H334 – H412 P210 – P261 – P280 P305+P351+P338 P302+P352 – P273 – P501
		Pentru informații cu privire la siguranță consultați Fișa cu Date de Securitate. www.bio-rad.com



**BIO-RAD**

TeSeE™ Western blot  
3551169

<b>TeSeE™ WESTERN BLOT</b>		<b>3551169</b>
5A0010		2016-07-15
A: 5A0010	Ab I: 5A0010	Eprubetă de omogenizare: 5A0010
B: 5A0010	Ab II: 5A0010	
BI: 5A0010	PK: 5A0010	
(01)03610520478875		 3551169
(17)160715		
(10)5A0010		
		 5A0010

## II – ETICHETE REACTIV

**TeSeE™ TRUSA PURIFICARE**

5A0010

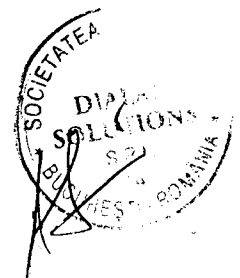
2019-01-15



T8283000019

862190

AR-FR-C.Charpentier – 2016-04

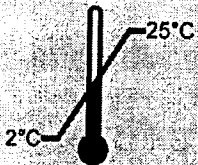


**TeSeE™ WESTERN BLOT**

Eprubete de omogenizare

1,4 ml  
x 35

TEST IN VITRO

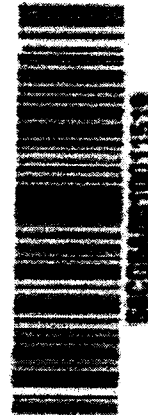


Bio-Rad  
92430 Marnes-la-Coquette - FRANCE



2019-01-  
15

LOT 010



853219

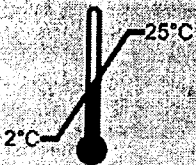
**TeSeE™ WESTERN BLOT**

Soluție de denaturare

A

20 ml

TEST IN VITRO

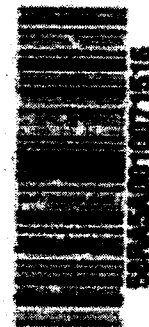


Bio-Rad  
92430 Marnes-la-Coquette - FRANCE



2016-07-  
15

LOT 5A0010

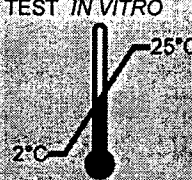



883226

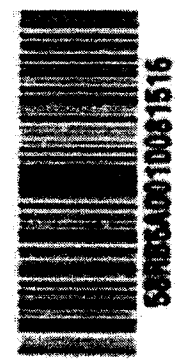


**BIO-RAD**



TeSeE™ Western blot  
3551169

<b>TeSeE™ WESTERN BLOT</b>	<b>B</b>
Soluție de clarificare	20 ml
TEST IN VITRO	
	
	

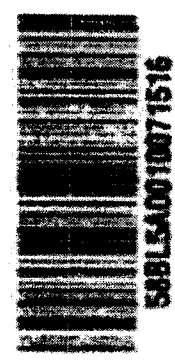
2016-08-15  
  
5A0010  
**LOT**



883214

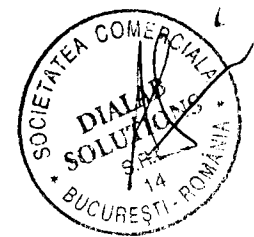
<b>TeSeE™ WESTERN BLOT</b>	<b>BI</b>
Soluție de blocare	10 ml
TEST IN VITRO	
	
Bio-Rad 92430 Marnes-la-Coquette - FRANCE	
	

2016-07-15  
  
5A0010  
**LOT**



883218

AR-FR-C.Charpentier – 2016-04



**TeSeE™ WESTERN BLOT**

Anti-PrP MAb (10x)  
AcM anti-PrP (10x)  
Anti-PrP MAK (10x)  
AcM anti-PrP (10x)  
AcM anti-PrP (10x)

**Ab I**

8 ml

TEST IN VITRO



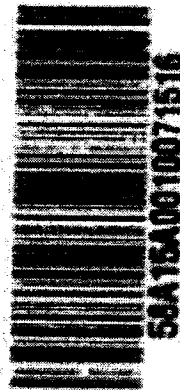
**Bio-Rad**  
92430 Marnes-la-Coquette - FRANCE



2016-07-15

5A0010

LOT



883218

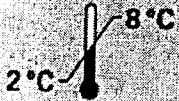
**TeSeE™ WESTERN BLOT**

Conjugat (10x)

**Ab II**

10 ml

TEST IN VITRO



**Bio-Rad**  
92430 Marnes-la-Coquette - FRANCE



2016-07-15

5A0010

LOT



883218



**BIO-RAD**

TeSeE™ Western blot  
3551169

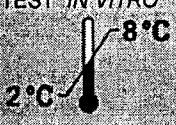
**TeSeE™ WESTERN BLOT** **PK**

---

Porteinaza K **0,5 ml**

---

TEST IN VITRO

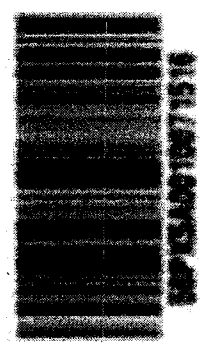



**2°C** **8°C**

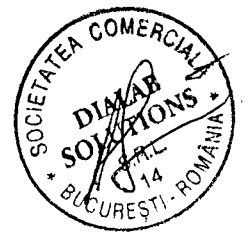
**Bio-Rad**  
92430 Marnes-la-Coquette

**LOT** 5A0010

2016-07-  
15



883235



AR-FR-C.Charpentier – 2016-04

*Antes*